
(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030043191 A
(43)Date of publication of application: 02.06.2003

(21)Application number: 1020010074244
(22)Date of filing: 27.11.2001

(71)Applicant: GOOFOO INC.
KOLON IND. INC./KR
(72)Inventor: KIM, SEONG HUN
PARK, U MUN
YOON, TAEK JUN

(51)Int. Cl. A61K 35/78

(54) IMMUNOSTIMULATING COMPOSITION CONTAINING ACANTHOPANAX SENTICOSUS EXTRACT, PROTEIN EXTRACT AND CRUDE PROTEOGLYCAN EXTRACTED FROM ACANTHOPANAX SENTICOSUS AS ACTIVE INGREDIENT AND FOOD OR FOOD ADDITIVE AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING IMMUNOSTIMULATING COMPOSITION

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are a food or food additive and a pharmaceutical composition including an immunostimulating composition containing an Acanthopanax Senticosus extract, a protein extract and a crude proteoglycan extract of Acanthopanax Senticosus from Acanthopanax Senticosus(Rupr. et Maxim.) Harms as an active ingredient.

CONSTITUTION: An Acanthopanax Senticosus extract is extracted in phosphate buffered saline(PBS), followed by agitation with a saturated ammonium sulfate solution to precipitate a protein fraction. Thereafter, the protein fraction is dissolved in the PBS, dialyzed and centrifuged to recover a supernatant. The supernatant is filtered and freeze-dried to produce a protein extract. The Acanthopanax Senticosus extract is dissolved in ethanol to give a final concentration of 70 to 80%, followed by light agitation and centrifugation to produce a precipitate. The precipitate is dissolved in distilled water, dialyzed and freeze-dried to produce a crude proteoglycan extract.

© KIPO 2003

Legal Status

Date of request for an examination (20011127)

Final disposal of an application (application)

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. 7
A61K 35/78

(11) 공개번호 특허2003-0043191
(43) 공개일자 2003년06월02일

(21) 출원번호 10-2001-0074244
(22) 출원일자 2001년11월27일

(71) 출원인 주식회사 코오롱
경기 과천시 별양동 1-23

주식회사 구루
경기 성남시 분당구 백현동 산46-1 한국식품개발연구원 내

(72) 발명자 박우문
경기도 용인시 죽전동 1115 롯데아파트 303동 1401호

윤택준
경기도 고양시 일산구 성석동 1043번지

김성훈
서울특별시 강남구 대치2동 미도아파트 108동 1002호

(74) 대리인 유미특허법인
신명건

심사청구 : 있음

(54) 한국산 가시오갈피에서 추출한 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 유효성분으로 하는면역증강용 조성물 및 상기 면역증강용 조성물을 함유한식품 또는 식품첨가제 및 약제 조성물

요약

본 발명은 한국산 가시오갈피에서 추출한 한국산 가시오갈피추출물을 추출하고 상기 한국산 가시오갈피추출물에서 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 추출하여 상기 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물에 관한 것이다.

또한 본 발명은 상기 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물을 함유하는 식품 또는 식품첨가제 및 약제조성물에 관한 것이다.

본 발명자들은 상기 한국산 가시오갈피에서 추출한 한국산가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물이 미치는 유사분열물질(미토젠: mitogen)에 대한 반응성, 싸토킨(cytokine)의 유도, 급성독성시험, 간 및 신장에 미치는 효과, 암전이 예방효과, 암전이 치료효과, 종양세포의 살해능, 자연살해세포 활성화에 미치는 영향, 항체생산에 미치는 효과, 지연성과민반응의 증진효과, T-세포의 활성화, 림프구의 활성화, 항원특이적 싸토킨(cytokine)의 유도활성에 관한 연구를 통하여 한국산 가시오갈피추출물, 특히 단백질추출물, 조단백다당류추출물이 면역증강에 유효한 효과가 있음을 확인하였다.

상기 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물을 함유한 식품 또는 식품첨가제 및 약제조성물은 남녀 또는 연령에 관계없이 면역을 증강시킬 수 있으며, 특히 만성질환자에게 효과가 있음을 확신한다.

대표도

도 1

색인어

한국산 가시오갈피, 한국산 가시오갈피추출물, 한국산 가시오갈피 단백질추출물, 한국산 가시오갈피 조단백다당류추출물

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 한국산 가시오갈피의 단백질추출물에 함유된 단백질성분의 분자량을 나타내는 전기영동 결과이다.

도 2는 한국산 가시오갈피추출물의 단백질추출물을 단백질의 항체와 결합시켜 단백질추출물의 단백질 존재유무와 크기를 규명하는 웨스턴 블롯팅(Western Blotting)의 결과이다.

도 3은 한국산 가시오갈피 조추출물을 첨가한 대조군과 한국산 가시오갈피 조추출물과 항체를 첨가한 실험군의 흡광도(O.D.)값을 비교측정하여 한국산 가시오갈피추출물이 미치는 대식세포의 씨토킨(TNF- α) 유도억제능에 대한 결과이다.

도 4는 한국산 가시오갈피 조추출물을 첨가한 대조군과 한국산 가시오갈피 조추출물과 항체를 첨가한 실험군의 흡광도(O.D.)값을 비교측정하여 한국산 가시오갈피추출물이 미치는 대식세포의 씨토킨(IL-1) 유도억제능에 대한 결과이다.

도 5는 한국산 가시오갈피 조추출물을 첨가한 대조군과 한국산 가시오갈피 조추출물과 항체를 첨가한 실험군의 흡광도(O.D.)값을 비교측정하여 한국산 가시오갈피추출물이 미치는 대식세포의 씨토킨(IFN- γ) 유도억제능에 대한 결과이다.

도 6은 한국산 가시오갈피 조추출물을 첨가한 대조군과 한국산 가시오갈피 조추출물과 항체를 첨가한 실험군의 흡광도(O.D.)값을 비교측정하여 한국산 가시오갈피추출물이 미치는 대식세포의 씨토킨(IL-6) 유도억제능에 대한 결과이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물을 함유하는 식품 또는 식품첨가제 및 약제조성물에 관한 것이다.

본 발명과 관련하여 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 식물은 전세계의 온대 및 열대에 광범위하게 분포하고 있으며 약 60속 600종류 이상이 있고 목본 또는 초본으로서 자생한다. 우리나라의 두릅나무과 종류는 약 20종이 있으며 가시오갈피나무 종류는 15종으로 밝혀져 있는데 대표적으로 가시오갈피(Acanthopanax Senticosus), 왕가시오갈피나무(Acanthopanax Senticosus Var. Koreanus), 민가시오갈피나무(Acanthopanax Senticosus Var. inermis), 단경오갈피나무(Acanthopanax Sessmuorus), 지리산 오갈피나무(Acanthopanax Chilsanensis), 서울 오갈피나무(Acanthopanax Seoulensis), 털오갈피나무(Acanthopanax Rufinerve), 섬오갈피나무(Acanthopanax Koreanm), 당오갈피나무(Acanthopanax Siebololianum)가 있다. 이 중에서 한국에서 주로 식재하는 오갈피나무는 가시오갈피(Acanthopanax Senticosus), 단경오갈피나무(Acanthopanax Sessmuorus), 지리산 오갈피나무(Acanthopanax Chilsanensis), 서울 오갈피나무(Acanthopanax Seoulensis), 털오갈피나무(Acanthopanax Rufinerve), 당오갈피나무(Acanthopanax Siebololianum)이다.

특히 한반도, 시베리아, 중국 등지에 자생하는 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)는 라일라세에(*Raliaceae*)에 속하는 다년생 관목으로서 우리나라를 비롯한 동양에서는 그 뿌리, 줄기, 잎 및 열매를 한약제로 사용하여 왔다.

상기 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)의 뿌리에는 엘레우테로사이드(*eleutherosides*) A, B, C, D, E, F, G 7가지 성분의 구성비율이 8:30:10:12:4:2:1로 존재하고 엘레우테로사이드(*eleutherosides*) B는 경(줄기)과 근피에 가장 많이 존재하고 엘레우테로사이드(*eleutherosides*) A, C, D, E는 경피(줄기껍질)와 과육에 가장 많이 존재한다.

상기 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)의 잎 중에는 엘레우테로사이드(*eleutherosides*) I, K, L, M과 센티코사이드(*Senticoside*) A, B, C, D, E, F가 함유되어 있다.

상기 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)의 열매 중에는 아칸소사이드(*Acanthoside*) D와 치사노사이드(*Chisanoside*)가 주성분으로 함유되어 있다.

구 소련의 브레이크만(*Breckhman*)박사가 1963년 가시오갈피에 '외인성 비특이적인 해로운 자극에 대한 저항력 증진 효과' 즉, 적응원(*adaptogen*)으로서의 효능이 있음을 입증한 이래 인삼과 함께 국내외 학자들의 연구대상이 되고 있다.

시베리아계 인삼(*Siberian Ginseng*)이라고 불리우는 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)는 신체활력의 강화, 비장 및 신장의 강화의 목적으로 쓰이고 진정, 진통, 식욕부진이나 피로의 회복효능이 있는 것으로 입증되었다. 또한 중추신경계에 있어서 진정작용이 있으며 실험에 따라서는 진정과 흥분작용의 양면성을 나타내어 인삼과 같이 적응원(*Adaptogen*)의 성격을 보이거나 그 작용기전에 있어서 상이함이 증명된 바 있다.

서울대학교 천연물과학연구소의 논문에 따르면 상기 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)를 인삼과 비교시 생리작용은 유사하지만 가시오갈피가 인삼을 능가하는 것은 흥분작용이나 강장작용이 그 지속시간으로 볼 때 인삼보다 훨씬 길고 강하며, 인삼은 드물게 불면증을 유발하지만 가시오갈피는 불면증을 유발하지 않는다고 보고하였다. 또한 가시오갈피는 인삼에 비해 흥분상태의 진정작용, 스트레스 억제효과, 급성 만성 방사능 피복, 당뇨증상 등에 대해 우수한 효능을 나타내었다고 보고하였다.

한국가시오갈피 재배협회는 능동회피실험장치를 통한 한국산 가시오갈피의 기억력 증진효과 실험 결과, 가시오갈피를 투여하지 않은 대조군에 비해 가시오갈피를 투여한 실험군의 기억증진효과가 34.5% 증가하였다고 보고하였다.

브레이크만(*Breckhman*)박사와 다르디모프(*V. Dardymov*)박사는 가시오갈피가 혈당을 저하시켜 당뇨병에 대해 효과가 있고, 항방사선에 대해 효과가 있으며, 가시오갈피의 투여로 관상동맥의 혈압개선, 동맥혈압의 정상화, 단백질 및 지질대사의 정상복귀, 혈중 콜레스테롤의 감소, 베타 리포프로테인(β -lipoprotein)치의 감소가 있다고 보고하였다. 또한 정신장애의 해소, 심장맥 관계질환의 치료효과 등을 보고하였다.

현재까지 가시오갈피에 대한 출원은 주로 가시오갈피의 배양방법, 대량생산방법이 대다수로 대표적으로 생물공학적인 기술에 의한 가시오갈피 묘목의 대량생산방법(대한민국공개특허공보 제1999-0064391호), 체세포 배를 이용한 가시오갈피의 번식방법(등록특허공보 제10-0257991호), 생물기 배양법에 의한 가시오갈피 유식물체의 배양방법 및 그 용도(대한민국공개특허공보 제2001-0010217호) 등이 출원되어 있으나, 가시오갈피를 실제 이용할 수 있는 식품이나 약제에 적용하는 연구나 특허출원 등은 아직 미비한 상태이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 발명자들은 한국산 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)를 재료물질로 한국산 가시오갈피추출물을 추출하고, 상기 한국산 가시오갈피추출물에서 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 다시 추출하여, 상기 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 투여한 실험군과 대조군으로 유사분열물질(미토젠: mitogen)에 대한 반응성, 씨토킨(cytokine)의 유도, 급성독성시험, 간 및 신장에 미치는 효과, 암전이 예방효과, 암전이 치료효과, 종양세포의 살해능, 자연살해세포 활성화에 미치는 영향, 항체생산에 미치는 효과, 지연성 과민반응의 증진효과, T-세포의 활성화, 림프구의 활성화, 항원특이적 씨토킨(cytokine)의 유도활성에 대한 작용을 실험한 결과를 토대로 대조군에 비해 실험군에서 월등히 유효하게 작용함을 입증하고, 상기 한국산 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)에서 추출한 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물을 제공하는데 목적이 있다.

또한 본 발명은 한국산 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)에서 추출한 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물을 함유한 식품 또는 식품첨가제 및 약제를 제공하는데 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

전술한 기술적 과제를 해결하기 위한 본 발명은 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물을 함유하는 식품 또는 식품첨가제 및 약제조성물에 관한 것이다.

이하 본 발명인 한국산 가시오갈피에서 한국산 가시오갈피추출물을 추출하는 단계, 상기 한국산 가시오갈피추출물에서 추출한 단백질추출물과 조단백다당류추출물의 효능을 입증하는 실험단계는 다음과 같다.

한국산 가시오갈피에 증류수를 첨가하여 수용성 추출물을 제조하는 단계; 상기 수용성 추출물을 70% 암모늄 설페이트(NH_4SO_4) 침전법으로 단백질분획을 분리 하고 전기영동으로 특성을 조사하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물로부터 80% 에탄올(ethanol)을 이용하여 조단백다당류를 침전시키는 단계; 상기 추출된 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물이 미치는 면역관련세포의 유사분열물질(mitogen)의 활성을 검증하는 단계; 상기 추출된 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물의 씨토킨(cytokine)을 유도하는 정도를 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 급성독성시험을 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물이 간 및 신장에 미치는 영향을 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 암전이 예방효과를 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 암전이의 치료효과를 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 종양세포의 살해능을 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 자연살해세포(Natural Killer Cell; 이하 NK-cell이라 약칭함) 활성화정도를 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 세포 활성화에 의한 종양세포의 살해능을 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 항원에 대한 항체생성에 미치는 효과를 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 지연성 과민반응에 미치는 영향을 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 T-세포에 미치는 활성을 검증하는 단계; 상기 한국산 가시오갈피추출물의 항원 특이적인 림프구의 활성화에 미치는 영향을 검증하는 단계; 및 상기 한국산 가시오갈피추출물의 항원특이적 씨토킨(cytokine)의 유도활성을 검증하는 단계로 구성된다.

이하 본 발명은 면역증강용 조성물의 기능에 대한 확인을 위해 이하, 실시예, 비교예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예, 비교 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예, 비교예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

한국산 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)추출물의 제조

본 발명의 재료물질인 한국산 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)는 강원도 삼척지역에서 자생한 것을 사용하였다. 한국산 가시오갈피(*Acanthopanax Senticosus*)의 사용부위는 줄기, 열매, 잎, 뿌리를 모두 포함하였다. 상기 한국산 가시오갈피를 증류수로 세척하고 건조하여 진공포장하며 추출시까지 -80°C 에서 냉동보관하였다. 상기 냉동된 한국산 가시오갈피를 세절하고 증류수를 혼합하여 믹서에 분쇄하였다. 상기 분쇄된 한국산 가시오갈피 중량의 10배가 되는 증류수를 넣고 4절단하여 4°C 에서 12시간 교반하였다. 상기 교반된 한국산 가시오갈피를 20분 동안 10000rpm으로 원심분리하고 상등액을 수집하여 망크기(pore size)가 $0.22\mu\text{m}$ 인 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과시키며 동결건조하여 추출물을 생산하였다.

실시예 2

한국산 가시오갈피의 수용성 추출물에서 단백질추출물의 분리 및 특성 조사

한국산 가시오갈피를 0.15M 인산완충살린용액(phosphate buffered saline: 이하 PBS라 약칭함)으로 추출하고 100% 포화 암모늄 설페이트(NH_4SO_4) 용액을 첨가하여 추출액의 최종농도가 70%가 되도록 조정하며 4°C 에서 12시간 동안 약하게 교 반하여 단백질분획을 침전시켰다. 상기 단백질침전물을 PBS로 용해하고 PBS로 2일간 투석하였다. 투석을 완료하고 20분동안 5,000rpm으로 원심분리하여 상등액을 회수하며 망크기(pore size)가 $0.22\mu\text{m}$ 인 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과하였다. 상기 여액을 동결건조하여 단백질추출물을 제조하였다. 상기과 같은 과정을 통해 한국산 가시오갈피로부터 회수한 단백질추출물의 회수율은 1.0%~10.0%이다.

또한, 단백질추출물을 구성하는 단백질성분의 분자량을 조사하기 위하여 13% 폴리아마이드 겔(polyamide gel)에서 전기영동하였다. 한국산 가시오갈피추출물 중 단백질추출물의 전기영동을 위해 완충용액 시료(sample buffer)로 20-머캅토에탄올(20-mercaptoethanol: 20-ME)이 함유된 비환원상태로 전기영동을 실시하였고 상기 실험결과를 도 1에 나타냈다. 상기 실험결과 나타난 한국산 가시오갈피추출물의 단백질분자량의 측정은 표준단백질의 이동거리를 측정하여 얻은 표준곡선에 대입하여 측정하였다.

측정결과 한국산 가시오갈피의 단백질은 약 4개의 분자량을 달리하는 단백질(75,000, 51,000, 30,000, 28,000)로

구성됨을 확인하였으며 가시오갈피추출물은 상기 4가지 단백질 외에 단백다당류, 다당류 및 기타 수용성 물질이 함유함을 추측할 수 있었다.

실시에 3

한국산 가시오갈피추출물에서 조단백다당류의 분리

상기 냉동된 한국산 가시오갈피를 세절하고 증류수를 혼합하여 믹서에 분쇄하였다. 상기 분쇄된 한국산 가시오갈피 중량의 10배가 되는 증류수를 넣고 4절단 하고 4℃ 혹은 100℃에서 12시간 교반하였다. 각각의 추출물에 에탄올(ethanol)의 최종농도가 70%가 되도록 조정하여 약하게 12시간 교반하였다. 교반 완료 후 침전물을 회수하기 위하여 원심분리(15000rpm/20분)를 실시하였다. 상기 원심분리에 의해 수집된 침전물을 증류수에 녹인 후에 증류수에 대하여 투석을 실시하였다. 투석 완료 후 수집된 물질을 동결건조하여 조단백다당류 분획을 제조하였다.

가시오갈피추출물 및 단백질 분획에 대한 항체 생산

조추출물 100 μ g 및 조단백질 20 μ g을 0.01M PBS 50 μ l에 용해하고 동량의 프로인트 완전유화제(Fraund's complete adjuvant: FCA)를 혼합하여 유화시키며 balb/c마우스에 피하주사로 1차 면역 실시하였다. 3주 후에 상기와 같은 동일한 항원을 프로인트 불완전유화제(Fraund's incomplete adjuvant: FIA)로 유화시켜 2차면역을 실시하였다. 2차 면역 2주 후에 항원만을 복강에 부스팅(boosting)면역하고 면역 4일 후에 마우스로부터 혈액을 수집하였다. 혈액으로부터 각 항원에 대한 항 혈청은 혈액을 5000rpm로 10분간 원심분리하여 수집하였다. 수집한 항 혈청은 사용시까지 -20℃에 보관하였다.

한국산 가시오갈피추출물 및 단백질추출물의 항체를 이용한 단백질의 존재유무와 크기

한국산 가시오갈피추출물 및 단백질추출물을 실시에 2와 같이 전기영동하고 전기영동이 된 겔(gel)을 플루오르수지 막(PVDF membrane)에 천사(transfer)하였다. 단백질이 천사된 막(membrane)을 3% 보빈 세럼 알부민(bovine serum albumin: BSA)으로 저해(blocking)하고 1000배($\times 1000$)로 희석된 단백질추출물에 대한 항 혈 청을 넣고 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 세척액(PBS-Tween; 이하 PBS-T라 약칭함)으로 5회 막(membrane)을 세척하고 마우스 면역글로블린(mouse IgG)에 대한 항체에 HRP(peroxidase)가 표지된 2차 항체-HRP(Zymend. $\times 4000$)를 넣어 2시간 반응시켰다. 상기 반응이 완료하면 PBS-T로 5회 막(membrane)을 세척하고 ECL kit(Amersham 사)를 이용하여 막을 분석하였다. 상기 전기영동에 의한 한국산 가시오갈피추출물 중 단백질추출물이 하전된 결과를 도 2에 나타내었으며 반응이 뚜렷하게 나타나지 않았지만 2개의 대조군과 비교시 유의한 차이를 보였다. 또한 웨스턴 블롯팅(western blotting, immunoblotting)에 의한 단백질의 존재유무와 크기를 확인한 결과를 도 3에 나타내었다. 항체와 반응한 가시오갈피추출물은 전기영동상에서 잘 발현되지 않던 밴드(band)가 나타남으로서 소량의 기타 단백질이 함유됨을 알 수 있었다. 웨스턴 블롯팅(western blotting, immunoblotting) 분석결과 200,000 이상의 거대한 분자량을 가지는 단백질, 약 100,000, 약 75,000, 51,000, 28,000, 22,000 등 6종류의 단백질이 함유되는 결과를 얻었다. 상기과 같은 결과를 도 2에 나타내었다.

비교예 1

한국산 가시오갈피가 면역관련세포의 유사분열물질(mitogen)에 미치는 영향

6주령의 Balb/c 마우스 3마리를 한 그룹으로 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 각각 500 μ g/ml, 50 μ g/ml 및 50 μ g/ml를 혈관주사하고 1, 3, 5일 후에 마우스에서 비장세포(splenocyte)를 분리하였다. 96-웰 플랫-바텀 플레이트(96-well plat-bottom plate)의 각 웰(well)에 상기 분리한 비장세포(splenocytes)를 각각 5×10^5 /100 μ l의 밀도로 각 웰(well)에 넣고 T-세포 및 B-세포의 유사분열물질인 Con-A(Concavanallin-A)와 지질다당류(Lipopolysaccharide: 이하 LPS라 약칭함)의 최종농도가 각각 0.5 μ g/ml 및 5 μ g/ml이 되도록 농도로 조정하여 각 웰(well)에 처리 후 3일간 배양하였다. 림프구(Lymphocyte)의 증식분석(proliferation assay)은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]법으로 수행하였다. 5mg/ml의 농도로 조정된 MTT 시약을 각 웰(well)에 50 μ l 첨가하고 6시간 배양하였다. MTT시약은 세포가 생산하는 미토콘드리아(mitochondria dehydrogenase)와 반응하여 비수용성의 진청색인 포마잔(formazan)을 형성하였다. 배양 완료후 상등액을 버리고 각 웰(well)에 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide: DMSO) 100 μ l를 첨가하여 생성된 포마잔(formazan)을 용해시켜 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

상기 비교예 1의 결과를 이하 표 1에 평균치로 나타내었다.

[표 1]

한국산가시오갈피의 유사분열물질(mitogen)에 대한 반응성					
처리군			흡광도(평균 ± 표준편차)		
대조군/ 실험군	LPS (5 μ g/ml)	Con-A (0.5 μ g/ml)	한국산가시오갈피 추출물(500 μ g/ml)	단백질추출물 (50 μ g/ml)	조단백다당류 추출물(50 μ g/ml)
0일	-	-	0.25±0.06		
1일	-	-	0.27±0.05	0.25±0.04	0.26±0.07
3일	-	-	0.39±0.06	0.32±0.05	0.39±0.03
5일	-	-	0.33±0.04	0.25±0.05	0.32±0.09
0일	+	-	0.53±0.13		
1일	+	-	0.79±0.12	0.63±0.08	0.70±0.09
3일	+	-	1.08±0.16	0.76±0.11	0.86±0.13
5일	+	-	0.65±0.10	0.6±0.05	0.75±0.08
0일	-	+	0.58±0.06		
1일	-	+	0.83±0.09	0.70±0.04	0.77±0.07
3일	-	+	1.22±0.21	0.97±0.15	1.07±0.10
5일	-	+	0.93±0.09	0.75±0.06	0.85±0.09

표 1에 나타낸 결과와 같이 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 처리한 마우스의 비장세포는 시료무처리 대조군에 비하여 높은 흡광도(OD)를 나타내므로 본 발명의 재료물질인 한국산 가시오갈피는 생체내 면역담당세포인 비장세포를 자극함을 확인하였다. 또한 LPS(Lipopolysaccharide) 혹은 Con-A(Concavanallin-A)를 첨가하여 동시배양한 6주령의 Balb/c 마우스의 비장세포는 LPS 및 Con-A의 무처리군에 비하여 MTT 측정 결과 높은 흡광도(OD)값을 나타내므로, 본 발명은 면역관련세포의 유사분열물질(mitogen)에 대한 반응성을 증진시키는 결과를 나타냈다. 상기와 같은 결과로 본 발명은 성숙된 면역담당세포가 효과적인 면역반응을 유도케하는 세포반응성을 증진시키는 효과를 가지고 있어, 만약 외부로부터의 항원에 노출되었을 경우 본 발명이 투여된 생체는 항원 특이적인 면역반응을 위한 작동세포의 수를 증가시키므로 외부로부터의 항원에 대하여 효과적인 방어효과를 유도할 수 있음을 확인하였다.

비교예 2

한국산 가시오갈피추출물 및 상기 추출물의 단백질추출물, 조단백다당류추출물의 생리활성물질(cytokine)의 유도

C57BL/6마우스에 3% 티오글리콜레이트(thioglycollate) 1ml를 복강투여하고 3일 후에 마우스의 복강에서 세포(Peritoneal Exudative Cell; 이하 PEC라 약칭함)를 멸균적으로 수집하여 24웰 플레이트(24well plate)의 각 웰(well)에 1.5×10^6 /ml의 농도로 도말(plating)하였다. 2시간 정도 배양하고 PBS로 각 웰(well)을 세척하여 도말(plate)에 부착된 대식세포(macrophage)를 회수하였다. 각 웰(well)에 추출물(500 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62.5 μ g/ml), 단백질추출물(20 μ g/ml, 4 μ g/ml, 0.8 μ g/ml), 조단백다당류추출물(20 μ g/ml, 4 μ g/ml, 0.8 μ g/ml)을 여러농도로 조정하여 24시간 동안 동시배양하였다. 배양완료 후에 상등액만을 회수하고 상등액에 유도분비된 IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6 등 여러가지 생리활성물질인 싸토킨(cytokine)을 각 싸토킨 키트(cytokine kit)을 이용하여 측정하였다. 상기 싸토킨 키트에 의한 결과를 이하 표 2에 나타내었다.

[표 2]

대식세포에서 여러종류의 싸토킨(cytokines) 유도				
대조군/실험군	싸토킨(pg/ml): 평균 ± 표준편차			
	IL-1	TNF- α	IFN- γ	IL-6
대조군	0.5	8.6	58	25
양성대조군; LPS(5 μ g/ml)	127	851	8450	220
추출물(500 μ g/ml)	48	158	1580	421

추출물(125 μ g/ml)	55	125	4560	431
추출물(62.5 μ g/ml)	35	87	2522	211
단백질추출물(20 μ g/ml)	62	1458	750	148
단백질추출물(4 μ g/ml)	55	1156	9150	248
단백질추출물(0.8 μ g/ml)	25	558	9200	176
조단백다당류추출물(20 μ g/ml)	115	21	1560	325
조단백다당류추출물(4 μ g/ml)	87	36	7753	458
조단백다당류추출물(0.8 μ g/ml)	43	35	3546	226

표 2에 나타낸 바와 같이 한국산 가시오갈피추출물, 단백질추출물, 조단백다당류추출물은 대식세포를 직접 활성화시켜 여러가지 씨토킨(IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6)을 유도하는 면역자극효과가 있음을 확인하였다. 특히, 단백질추출물이 TNF- α , IFN- γ 의 씨토킨 유도활성에 직접적인 영향을 주는 성분으로 확인되었고, 씨토킨의 활성물질은 단백질 단일성분이 아니라 조단백다당류가 동시에 작용하는 결과를 나타냈다. 따라서 본 발명은 대식세포를 직접 자극하는 씨토킨 유도제(cytokine inducer)로의 활성이 있음을 확인하였다.

비교예 3

조추출물에서 분리한 단백질추출물이 미치는 대식세포로부터 씨토킨(cytokine)의 유도억제능

상기 비교예 2의 항체를 이용하여 단백질추출물이 미치는 대식세포로부터 씨토킨(cytokine)의 유도억제능을 조사하였다. 대조군으로 조추출물을 대식세포에 첨가하여 항원-항체 반응시키고, 실험군으로 조추출물과 비교예 2의 항체를 대식세포에 첨가하여 항원-항체 반응시켜 대조군과 실험군의 씨토킨(cytokine)유도능을 씨토킨 키트(cytokine kit)을 이용하여 측정하였다.

상기의 결과, 조추출물이 대식세포를 자극한 결과인 대조군은 여러가지 씨토킨(cytokine)을 유도하였고, 조추출물과 항체를 함께 첨가한 실험군은 여러가지 씨토킨(cytokine) 유도를 100% 억제하지는 않았으나 유의한 정도로 억제하였다. 상기 두가지의 결과에서 확인할 수 있는 것은 조추출물에서 씨토킨(cytokine)을 유도하는 물질은 항체와 반응하는 물질임을 확인할 수 있었다. 또한 상기 항체에 의한 씨토킨(cytokine)의 유도가 아니므로, 도 2에 나타난 웨스턴 블롯팅(Western Blotting)의 결과로 알 수 있는 것은 항체와 단백질분획 이외에 다른 성분의 물질도 씨토킨(cytokine)을 유도하는 활성물질이 있음을 확인하였다. 따라서, 씨토킨(cytokine)을 유도하는 면역자극물질은 항체와 반응하는 단백질과 그 외에 항체와 반응하기 어려운 다당류이다. 상기과 같은 결과를 도 3, 도 4, 도 5, 도 6에 도시하였다.

도 3은 한국산 가시오갈피추출물이 미치는 대식세포로부터 씨토킨(TNF- α)의 유도억제능을 나타내었다. 조추출물만을 투여한 군에서는 씨토킨(TNF- α)의 유도가 증진되었으나, 항체와 함께 투여한 군에서는 씨토킨(TNF- α)의 유도가 억제됨을 확인하였다. 상기과 같은 결과는 조추출물 내의 단백질분획이 항체와 반응하기 때문으로 나타났다.

도 4는 한국산 가시오갈피추출물이 미치는 대식세포로부터 씨토킨(IL-1)의 유도억제능을 나타내었다. 조추출물만을 투여한 군에서는 씨토킨(IL-1)의 유도가 증진되었으나, 항체와 함께 투여한 군에서는 씨토킨(IL-1)의 유도가 억제됨을 확인하였다. 상기과 같은 결과는 조추출물 내의 단백질분획이 항체와 반응하기 때문으로 나타났다.

도 5는 한국산 가시오갈피추출물이 미치는 대식세포로부터 씨토킨(IFN- γ)의 유도억제능을 나타내었다. 조추출물만을 투여한 군에서는 씨토킨(IFN- γ)의 유도가 증진되었으나, 항체와 함께 투여한 군에서는 씨토킨(IFN- γ)의 유도가 억제됨을 확인하였다. 상기과 같은 결과는 조추출물 내의 단백질분획이 항체와 반응하기 때문으로 나타났다.

도 6은 한국산 가시오갈피추출물이 미치는 대식세포로부터 씨토킨(IL-6)의 유도억제능을 나타내었다. 조추출물만을 투여한 군에서는 씨토킨(IL-6)의 유도가 증진되었으나, 항체와 함께 투여한 군에서는 씨토킨(IL-6)의 유도가 억제됨을 확인하였다. 상기과 같은 결과는 조추출물 내의 단백질분획이 항체와 반응하기 때문으로 나타났다.

상기 도 3, 도 4, 도 5, 도 6에 나타난 결과는 조추출물의 투여량에 따라 씨토킨(IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6)을 유도하는 정도가 달랐으나, 결과적으로 동일하게 항체와 함께 투여한 조추출물에서 씨토킨(IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6)의 유도가 억제되었다.

비교예 4

한국산 가시오갈피추출물의 생체내 급성독성 시험

25g의 웅성 Balb/c 마우스에 한국산 가시오갈피추출물의 투여는 혈관 및 경구투여로 실시하였으며 혈관주사의 경우 마우스당 2mg, 500 μ g, 125 μ g을 투여하였고, 경구투여의 경우 50mg, 10mg, 2mg을 투여하고 7일간 마우스의 생존율 및 체중을 조사하였다. 상기 생존율 및 체중을 이하 표 3, 표 4에 나타내었다.

[표 3]

추출물 투여에 대한 마우스의 생존율						
투여방법	투여용량	일/생존율(%)				체중변화 (%)
		1일	3일	5일	7일	
혈관주사	2mg	100	100	100	100	100
	500 μ g	100	100	100	100	100
	125 μ g	100	100	100	100	100
경구투여	50mg	100	100	100	100	100
	10mg	100	100	100	100	100
	2mg	100	100	100	100	100

[표 4]

추출물 투여로 인한 마우스의 체중변화						
대조군/실험군		일/평균무게(g) \pm 표준편차				체중변화 (%)
투여방법	투여용량	1일	3일	5일	7일	
대조군		20.0 \pm 0.3	20.1 \pm 0.4	20.2 \pm 0.4	20.3 \pm 0.3	101.5
혈관주사	2mg	20.0 \pm 0.4	19.9 \pm 0.6	20.0 \pm 0.4	20.2 \pm 0.3	101.0
	500 μ g	19.8 \pm 0.5	20.0 \pm 0.5	20.1 \pm 0.2	20.3 \pm 0.3	102.5
	125 μ g	20.6 \pm 0.4	20.6 \pm 0.3	20.8 \pm 0.4	20.9 \pm 0.5	101.5
경구투여	50mg	20.0 \pm 0.2	20.1 \pm 0.3	20.3 \pm 0.5	20.4 \pm 0.4	102.0
	10mg	20.5 \pm 0.4	20.6 \pm 0.5	20.6 \pm 0.4	20.9 \pm 0.4	101.9
	2mg	19.9 \pm 0.6	20.0 \pm 0.5	20.2 \pm 0.5	20.3 \pm 0.4	102.0

표 3과 표 4에 나타낸 바와 같이 실험군에서 외형적인 변화는 나타나지 않았고 시료무처리 대조군과 유사한 체중증가를 나타냄으로서 생체에 외형적인 부작용은 유도되지 않는 결과를 나타냈다.

비교예 5

간 및 신장의 기능에 미치는 효과

25g의 웅성 Balb/c 마우스에 한국산 가시오갈피추출물의 투여는 혈관 및 경구투여로 실시하였으며 혈관주사의 경우 마우스당 500 μ g을 투여하고 경구투여의 경우 20mg 투여하여 1, 3, 5일째에 생체에 대한 독성을 조사하기 위하여 체내의 신진대사에 관여하는 간(liver)에 미치는 영향으로 글루타믹-옥살아세테이트 전이효소(Glutamic-Oxalacetate Transaminase: 이하 GOT라 약칭함)와 글루타믹-피루베이트 전이효소(Glutamic-Pyruvate Transaminase: 이하 GPT라 약칭함)를, 신장에 미치는 영향으로 혈중 크레아틴(blood creatin; 이하 CRE라 약칭함)과 혈중 요소질소(Blood Urea Nitrogen; 이하 BUN이라 약칭함)의 혈중농도를 측정하였다. 상기 GOT, GPT, CRE, BUN의 결과치를 이하 표 5에 나타내었다.

[표 5]

추출물 투여로 인한 생체의 간 및 신장에 미치는 영향					
대조군/실험군		GOT (U/l)	GPT (mg/ml)	CRE (U/l)	BUN (mg/ml)
투여방법	조사일				
대조군		111± 6.0	38± 3.2	0.52± 0.02	19± 2.5
혈관주사 (500μg)	+ 1일	121± 3.9	36± 1.1	0.53± 0.05	18± 2.1
	+ 3일	108± 6.4	39± 2.5	0.55± 0.03	17± 2.0
	+ 5일	116± 7.1	35± 5.9	0.49± 0.02	19± 1.8
경구투여 (20mg)	+ 1일	105± 3.2	39± 6.1	0.52± 0.01	19± 2.0
	+ 3일	120± 1.5	37± 2.5	0.48± 0.02	20± 1.3
	+ 5일	116± 4.3	40± 6.6	0.50± 0.01	17± 2.1

표 5에 나타난 바와 같이 한국산 가시오갈피추출물 500μg의 혈관투여와 한국산 가시오갈피추출물 20mg의 경구투여 후 1, 3, 5일 째에 간에서 만들어지는 대사에 필요한 정상효소로서 GOT와 GPT를 측정하면 간접적으로 간의 손상 정도를 측정할 수 있는 GOT와 GPT의 혈중농도를 측정한 결과 대조군과 유사한 결과를 나타내어 한국산 가시오갈피추출물은 생체 신진대사에 관여하는 간에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

또한 신장의 기능을 나타내는 CRE(blood creatine)은 중정도의 노동을 했을 때 혈중 크레아틴이 증가하는데 본 비교예의 결과 한국산 가시오갈피추출물을 혈관 및 경구투여한 실험군의 결과와 투여하지 않은 대조군의 결과는 차이를 나타내지 않으므로 한국산 가시오갈피추출물이 신장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. BUN(Blood Urea Nitrogen)은 혈중에 존재하는 요소질소로서 조직의 붕괴정도, 단백섭취량, 소화관내 혈액, 생체내 수분량, 뇨량 등에 따라 크게 영향을 받는다. 본 비교예의 결과 대조군과 실험군의 BUN결과가 차이를 나타내지 않으므로 한국산 가시오갈피추출물이 BUN에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

비교예 6

한국산 가시오갈피추출물의 암전이 예방효과

C57BL/6 및 Balb/c 마우스와 동종의 고전이성 종양세포주인 콜론26-M3.1 폐암세포주(colon26-M3.1 lung carcinoma)를 마우스에 전이시키고 PBS를 혈관에 투여하여 대조군으로 처리하며, 한국산 가시오갈피추출물을 콜론26-M3.1 폐암세포주(colon26-M3.1 lung carcinoma)를 전이시킨 마우스의 혈관에 한국산 가시오갈피추출물을 각각 2mg, 500μg, 125μg를 투여하였다. 또한 중국산 가시오갈피추출물을 콜론26-M3.1 폐암세포주(colon26-M3.1 lung carcinoma)를 전이시킨 마우스의 혈관에 중국산 가시오갈피추출물 각각 2mg, 500μg, 125μg를 투여하였다. 한국산 가시오갈피추출물을 콜론26-M3.1 폐암세포주(colon26-M3.1 lung carcinoma)를 전이시킨 마우스의 경구에 한국산 가시오갈피추출물 20mg, 5mg, 1.25mg, 단백질추출물 1mg, 조단백다당류추출물 1mg을 투여하였다. 상기 종양전이 억제 실험에 대한 결과를 이하 표 6, 표 7, 표 8에 나타내었다.

[표 6]

한국산 가시오갈피추출물과 중국산 가시오갈피추출물의 혈관투여에 의한 종양억제전이효과			
대조군/실험군	농도/마우스	콜론26-M3.1 폐암세포주의 전이정도(저해율%)	
		평균 ± 표준편차	범위
대조군	PBS	119 ± 19	90 ~ 143
한국산 가시오갈피추출물(4℃)	2mg	12 ± 9(89.9)	4 ~ 21
	500μg	16 ± 4(86.6)	11 ~ 20
	125μg	25 ± 12(79.0)	13 ~ 38

중국산 가시오갈피추출물(4℃)	2mg	32 ± 29(73.1)	9 ~ 69
	500μg	36 ± 12(69.7)	21 ~ 48
	125μg	81 ± 14(31.9)	72 ~ 106

[표 7]

한국산 가시오갈피의 경구투여에 의한 종양억제전이효과			
대조군/실험군	농도/마우스	콜론26-M3.1 폐암세포주의 전이정도(저해율%)	
		평균 ± 표준편차	범위
대조군	PBS	129 ± 16	112 ~ 147
한국산 가시오갈피추출물(4℃)	20mg	35 ± 11(72.9)	22 ~ 48
	5mg	44 ± 15(65.9)	27 ~ 58
	1.25mg	78 ± 12(39.5)	65 ~ 89

[표 8]

한국산 가시오갈피추출물, 단백질을추출물, 조단백다당류추출물의 경구투여에 의한 종양전이억제 효과			
대조군/실험군	농도/마우스	콜론26-M3.1 폐암세포주의 전이정도(저해율%)	
		평균 ± 표준편차	범위
대조군	PBS	129 ± 16	112 ~ 147
추출물	20mg	35 ± 11(72.9)	22 ~ 48
조단백다당류추출물	1mg	25 ± 18(80.6)	9 ~ 46
단백질추출물	1mg	41 ± 20(68.2)	20 ~ 63

표 6에 나타난 바와 같이 한국산 가시오갈피추출물의 혈관투여는 투여량에 비례하여 종양전이 저해율이 증가하여 한국산 가시오갈피추출물은 약 90% 정도의 높은 종양전이 억제능을 유도하였다. 한국산과 중국산 가시오갈피추출물 중 투여량을 비교시 종양전이 저해율은 중국산 가시오갈피추출물에 비하여 유의하게 높은 활성이 있는 것으로 나타났다.

한편 표 7에 나타난 바와 같이 한국산 가시오갈피추출물 20mg, 5mg, 1.25mg을 경구투여시 저해율이 72.9%, 65.9%, 39.5%로 감소하여 나타나 한국산 가시오갈피추출물의 경구투여량에 비례하여 종양전이 저해율이 증가하는 것으로 나타나 종양전이 억제활성이 있음을 확인하였다.

표 8에 나타난 바와 같이 한국산 가시오갈피추출물에서 분리한 단백질추출물, 조단백다당류추출물을 경구투여한 결과 한국산 가시오갈피추출물보다는 상기 추출물을 구성하고 있는 조단백다당류에 의한 종양전이 저해율이 가장 높게 나타났다. 그러나 주된 종양전이 저해율이 조단백다당류에 의한 것이지만 오로지 조단백다당류에 의한 종양전이 저해율만을 단정할 수 없었다. 왜냐하면 기타 저분자 물질 혹은 배당체가 관여하여 종양전이를 억제함을 배제할 수 없기 때문이다.

비교예 7

한국산 가시오갈피추출물의 암전이 치료효과

C57BL/6 및 Balb/c 마우스와 동종의 고전이성 종양세포주인 콜론26-M3.1 폐암세포주(colon26-M3.1 lung carcinoma)를 마우스에 전이시키고 PBS를 혈관에 투여하여 대조군으로 처리하였다. 한국산 가시오갈피추출물을 콜론26-M3.1 폐암세포주(colon26-M3.1 lung carcinoma)를 마우스에 전이시킨 1, 4, 7일 후에 한국산 가시오갈피추출물을 상기 마우스의 혈관에 각각 20mg, 5mg, 1.25mg 투여하였다. 또한 C57BL/6 및 Balb/c 마우스와 동종의 고전이성 종양세포주인 콜론26-M3.1 폐암세포주(colon26-M3.1 lung carcinoma)를 마우스에 전이시키고 PBS를 경구투여하여 대조군으로 처리하였다. 한국산 가시오갈피추출물을 콜론26-M3.1 폐암세포주(colon26-M3.1 lung carcinoma)를 마우스에 전이시킨 1, 4, 7일 후에 한국산 가시오갈피추출물을 각각 20mg, 5mg, 1.25mg을 마우스에 경구투여하였다.

[표 9]

한국산 가시오갈피의 혈관투여에 의한 종양전이 치료효과			
대조군/실험군	농도/마우스	콜론26-M3.1 폐암세포주의 전이정도(저해율%)	
		평균 ± 표준편차	범위
대조군	PBS	156 ± 23	132 ~ 180
한국산 가시오갈피추출물(4℃)	20mg	59 ± 15(62.2)	43 ~ 76
	5mg	81 ± 11(48.1)	68 ~ 93
	1.25mg	107 ± 21(31.4)	86 ~ 125

[표 10]

한국산 가시오갈피의 경구투여에 의한 종양전이 치료효과			
대조군/실험군	농도/마우스	콜론26-M3.1 폐암세포주의 전이정도(저해율%)	
		평균 ± 표준편차	범위
대조군	PBS	156 ± 23	132 ~ 180
한국산 가시오갈피추출물(4℃)	20mg	66 ± 11(57.7)	53 ~ 78
	5mg	87 ± 15(44.2)	70 ~ 103
	1.25mg	124 ± 12(20.5)	109 ~ 137

표 9과 표 10에 나타낸 바와 같이 폐암세포주에 대한 한국산 가시오갈피추출 물의 혈관투여와 경구투여의 대조군에 비하여 한국산 가시오갈피추출물을 투여한 실험군에서 투여량에 비례하여 종양전이 유도가 감소하였다. 또한 폐암세포주에 대한 한국산 가시오갈피추출물의 혈관투여와 경구투여시 각각의 동량을 비교시 경구투여보다 혈관투여시 종양전이 치료효과가 높게 나타났다. 본 비교예에 의하여 실험적으로 종양의 치료효과가 확인된 것은 상기 한국산 가시오갈피추출물이 숙주의 면역체계를 비특이적으로 자극한다는 사실을 입증하는 것으로서 본 발명은 여러가지 외래항원에 대하여 강한 면역반응을 유도하여 숙주의 항상성을 가지게 하는 활성이 있음을 확인하였다.

비교예 8

대식세포 활성화에 의한 종양세포의 살해능

25g의 웅성 Balb/c 마우스 각각에 정맥주사로 한국산 가시오갈피추출물 500 μ g, 125 μ g, 62.5 μ g를 투여하고 2일 후에 각각의 마우스에서 대식세포(macrophage; Effector cell; E)를 취하여 종양세포(Sarcoma-180: 이하 S-180이라 약칭함; Target cell; T)와 20시간 동안 동시배양하였다. 배양완료 후에 S-180의 증식억제 활성을 MTT법으로 조사하였다.

[표 11]

추출물을 투여한 마우스 대식세포의 종양세포살해능			
추출물의 농도 (μg /마우스)	E/T ratio(저해율%± 표준편차)		
	10	5	2.5
대조군	25.2 ± 3.5	19.3 ± 2.9	7.6 ± 0.2
500 μg /마우스	61.3 ± 6.4	40.2 ± 1.6	26.1 ± 11.4
125 μg /마우스	74.8 ± 5.8	55.2 ± 5.6	35.4 ± 2.1
62.5 μg /마우스	42.5 ± 6.2	28.3 ± 5.1	15.6 ± 2.6
효과세포/표적세포비율(E/T ratio) = 효과세포/표적세포(Effector cell / Target cell)효과세포 / 표적세포)			

본 비교예는 비교예 2에서 한국산 가시오갈피추출물이 대식세포의 활성화에 영향을 미친다는 것을 바탕으로 한국산 가시오갈피추출물이 투여된 마우스의 대식세포가 종양세포에 대한 살해활성을 유도하는지 확인하고자 실시하였다. 표 11에 나타난 바와 같이 한국산 가시오갈피추출물을 투여한 마우스의 대식세포(macrophage)의 실험군은 시료무처리 대조군에 비하여 약 3배 이상의 종양증식 억제 활성을 가지는 결과를 나타냈고, 특히 한국산 가시오갈피추출물 125 μg 을 처리한 실험군에서 종양세포에 대한 높은 살해활성을 나타내었다. 상기와 같은 결과로 알 수 있는 것은 생체 실험(in vivo)에서 대식세포를 활성화시키는 시료의 적정농도는 500 μg /마우스~62.5 μg /마우스이었으며, 보다 바람직한 적정농도는 125 μg /마우스인 결과를 보였다.

비교예 9

자연살해세포(Natural killer cell; 이하 NK-cell) 활성화에 미치는 효과 측정

25g의 웅성 Balb/c 마우스에 한국산 가시오갈피추출물 500 μg , 125 μg , 62.5 μg 을 정맥주사하고 3일 후에 마우스의 비장을 멸균적으로 수확하여 비장세포(Effector cell; E)와 NK-세포에 민감세포주인 YAC-1(Target cell; T)을 동시에 6일간 배양하였다. 배양 후 비장세포(Effector cell; E)와 NK-세포에 민감세포주인 YAC-1(Target cell; T)의 살해 정도를 측정하였고 NK-세포에 의한 살해효과는 이하와 같은 식으로 산출하였다.

측정방법은 살해된 세포가 유리하는 락테이트 디하이드로겐에이즈(lactate dehydrogensae:LDH)의 양을 Kit(LDH kit)로 측정하였다.

NK 활성(%) = [실험적 유리량(experimental release) - 자연적 유리량(spontaneous release) / 최대 유리량(maximum release) - 자연적 유리량(spontaneous release)] × 100

[표 12]

자연살해세포 활성화에 미치는 영향				
추출물의 농도 (μg /마우스)	E/T ratio(평균± 표준편차)			
	100	50	25	12.5
대조군	27.5 ± 5.5	22.6 ± 6.3	16.8 ± 3.1	8.5 ± 2.1
500 μg /마우스	54.6 ± 5.5	49.6 ± 5.8	35.9 ± 5.1	22.4 ± 3.6
125 μg /마우스	66.6 ± 8.7	53.6 ± 4.5	42.8 ± 3.6	30.2 ± 1.5
62.5 μg /마우스	35.7 ± 5.1	30.3 ± 3.6	20.3 ± 4.2	12.5 ± 2.3

표 12에 나타난 바와 같이 상기 한국산 가시오갈피추출물을 투여한 마우스의 비장세포는 정상마우스에 비하여 약 3배 정도의 NK-활성을 나타내었으며 그 정도는 E/T 비율에 비례하여 마우스에서 유효한 활성을 나타내는 상기 한국산 가시오갈피추출물의 농도는 500 μg ~62.5 μg 로 나타났으며, 보다 바람직하게는 한국산 가시오갈피추출물의 농도는 125 μg 로 나타났다.

비교예 10

한국산 가시오갈피추출물이 항체생산에 미치는 효과

항원(Pre-S2; 간염유발바이러스에서 면역원성을 나타내는 부분)만은 마우스에 투여하여 대조군으로 하였다. 대조 면역증강제로 1% 알루미늄 하이드록사이드(aluminium hydroxide: alum)를 사용하여 항원(Pre-S2; 간염유발바이러스에서 면역원성을 나타내는 부분)과 함께 투여하여 대조군으로 하였다. 실험군으로 한국산 가시오갈피추출물을 마우스당 500 μ g의 농도로 동시에 혼합하여 면역 하였다. 항원(Pre-S2; 간염유발바이러스에서 면역원성을 나타내는 부분)의 면역은 2주간격으로 총 2회 마우스당 5 μ g을 피내주사하고 최초면역 1주 후부터 10주까지 총 4회 실시하여 체혈하였다. 상기 체혈한 혈액 중에서 혈청을 분리 후 엘리사(ELISA)법으로 항체의 역가를 측정하였다. 항원인 Pre-S2의 키홀 림펫 헤모시안닌(Keyhole Limpet Hemocyanin: KLH)을 엘리사 플레이트(ELISA plate)에 5 μ g/ml를 코팅(coating)하고 BSA로 차단(blocking)하여 준비한 혈청을 20배부터 5배씩 희석하며 각 웰(well)에 넣고 항체-항원 반응시켰다. 2시간 동안 배양(incubation)하고 세척액(PBS-Tween)으로 각 웰(well)을 세척하여 마우스에 대한 2차 항체에 HRP가 접합된 염소 항 마우스 IgG-HRP(Goat anti-mouseIgG-HRP; Zymed)를 첨가하였다. 다시 항원인 Pre-S2의 키홀 림펫 헤모시안닌(Keyhole Limpet Hemocyanin: KLH)과 염소 항 마우스 IgG-HRP(Goat anti-mouseIgG-HRP; Zymed) 반응시키고 세척하여 기질용액(TMB)을 첨가하며 발색시켰다. 10분간 배양하고 정제액(2N-H₂SO₄)을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 항체의 역가는 대조군의 혈액이 나타내는 흡광도(OD)값의 3배되는 실험군의 최대 희석비로 나타내었다.

[표 13]

한국산 가시오갈피추출물이 항체 생산에 미치는 영향						
면역조건			항체의 역가(평균 \pm 표준편차)			
Pre-S2	alum	본 발명	1주 후	3주 후	5주 후	10주 후
+	-	-	338 \pm 38	6,150 \pm 453	8,220 \pm 562	3,560 \pm 654
+	+	-	1,960 \pm 556	389,000 \pm 110,000	370,000 \pm 150,560	55,000 \pm 12,500
+	-	+	1,200 \pm 380	256,500 \pm 56,800	220,000 \pm 89,000	35,000 \pm 10,000

표 13에 나타낸 바와 같이 한국산 가시오갈피추출물을 투여한 실험군은 면역 증강제인 알루미늄(alum)을 첨가한 실험군에 비하여 낮은 항체생산능을 나타냈지만 항원 Pre-S2를 처리한 대조군에 비하여는 약 40배 이상의 높은 항체생산능을 유도하여 한국산 가시오갈피추출물은 항원 특이적인 면역능을 증진시키는 활성이 있음을 확인하였다. 본 비교예는 외인성 항원에 대한 항원 특이적 면역계 중 체액성 면역계 반응을 확인하여 한국산 가시오갈피추출물이 세균, 미생물 등의 감염에 대한 방어능을 유도할 수 있음을 확인하였다.

비교예 11

지연성 과민반응(Delayed Type Hypersensitivity: 이하 DTH라 약칭함)의 증진

Balb/c 마우스에 항원으로 20 μ g의 키홀 림펫 헤모시안닌(Keyhole Limpet Hemocyanin: 이하 KLH라 약칭함)을 투여하여 대조군으로 사용하였다. 한국산 가시오갈피추출물을 각각의 마우스에 500 μ g, 125 μ g, 62.5 μ g을 피하주사로 투여하여 실험군으로 사용하였다. 한국산 가시오갈피추출물의 최초투여 4주 후에 마우스의 족저(footpad)에 KLH를 20 μ g을 주사하고 주사부위에 형성되는 부종의 두께를 측정하여 DTH 반응을 조사하였다.

[표 14]

한국산 가시오갈피추출물이 지연성 과민반응 유도에 미치는 영향					
농도	족저의 팽윤정도(평균% \pm 표준편차) / 일				
	1	2	3	4	5

대조군	0.5±0.1	0.4±0.2	0.6±0.1	0.4±0.2	0.5±0.1
대조군(항원단독투여군)	1.6±0.2	1.0±0.3	0.7±0.2	0.5±0.1	0.6±0.2
실험군 : 500 μ g	25.7±6.9	18.9±7.8	11.6±8.6	7.8±3.5	3.6±2.1
125 μ g	23.5±8.9	22.6±9.8	18.5±9.6	9.6±5.6	4.5±3.1
62.5 μ g	15.6±5.6	12.5±7.2	8.4±3.2	3.2±1.1	2.6±2.1

표 14에 나타낸 바와 같이 한국산 가시오갈피추출물을 처리한 대조군은 항원에 의하여 유도되는 DTH반응의 시료무처리 대조군에 비하여 증가하였고 DTH반응의 활성은 투여된 한국산 가시오갈피추출물에 비례하여 DTH반응의 활성이 증가하였다. 상기와 같은 결과로서 한국산 가시오갈피추출물은 항원에 대한 T-세포의 분화활성(T-cell proliferation)과 같은 세포성 면역반응을 증진시키는 효과가 있음을 확인하였다.

비교예 12

한국산 가시오갈피추출물이 미치는 T-세포의 활성

항종양과 관련한 세포성 면역능의 증진효과를 측정하고자 본 추출물의 종양세포에 대한 CTL(Cytotoxic T Lymphocyte)활성 측정을 위하여 C57BL/6 마우스에 미토마이신(mitomycin)을 처리하고 불활성화된 P815 비만세포종(mastocytoma) 세포주를 처리하여 대조군으로 사용하였다. C57BL/6 마우스에 미토마이신(mitomycin)을 처리하고 불활성화된 P815 비만세포종(mastocytoma) 세포주를 처리하여 한국산 가시오갈피추출물을 혼합하여 2주 간격으로 2회 피하주사하여 실험군으로 사용하였다. 대조군과 실험군의 최종투여 10일 후에 마우스로부터 비장세포를 멸균적으로 수확하고 항원인 P815 세포주를 시험관내(in vitro)에서 6시간 동안 동시 배양하였다. 본 비교예에 의한 종양세포에 대한 세포성 면역능을 측정하는 CTL(Cytotoxic T Lymphocyte)활성의 측정은 배양종료 후에 사멸된 세포가 유리하는 락테이트 디하이드로겐네이즈(lactate dehydrogenase)의 양을 락테이트 디하이드로겐네이즈 키트(LDH kit)으로 측정하였다.

CTL활성(%)은 이하와 같은 공식에 의해 산출된다.

CTL활성(%) = [실험적 유리량(experimental release) - 자연적 유리량(spontaneous release) / 최대 유리량(maximum release) - 자연적 유리량(spontaneous release)] × 100

[표 15]

한국산 가시오갈피추출물이 T-세포에 미치는 영향				
농도	T-세포 활성정도(Cytotoxicity, 평균 \pm 표준편차)/E/T ratio			
	100	50	25	12.5
대조군(정상마우스)	2.0 ± 1.0	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.1
대조군(항원단독투여군)	36.1 ± 4.1	21.2 ± 3.2	15.4 ± 3.5	4.3 ± 1.1
실험군 500 μ g	78.4 ± 8.2	52.6 ± 4.6	38.5 ± 4.5	23.6 ± 4.2

표 15에 나타낸 바와 같이 항원인 P815 비만세포주가 면역된 마우스의 비장세포는 항원을 무처리한 대조군에 비하여 P815 비만세포주의 살해효과가 2%~36% 증가된 결과를 나타냄으로서 이중항원에 대한 비장세포의 살해효과가 증진된 결과를 나타냈다. 또한 동일한 조건에서 한국산 가시오갈피추출물 500 μ g을 동시에 투여한 마우스의 비장세포는 그 살해효과가 78% 정도 나타내어 항원만을 투여한 경우에 비하여 약 2배 이상 증가된 활성을 나타냈으며 그 살해정도는 E/T 비율이 비장세포(effector cell)/표적세포(Target cell)이므로 비장세포의 농도에 비례하였다. 상기 P815 비만세포주에 대한 살해효과는 주로 CTL에 의한 살해능으로 사료되는데 한국산 가시오갈피추출물은 종양에 대한 특이성을 가지는 세포성 면역능을 증진시키는 활성이 있는 결과를 나타냈다.

비교예 13

항원 특이적인 림프구의 활성화

대조군으로 비교예 12의 마우스로부터 분리한 비만세포종이 면역된 비장세포(responder)와 불활화 종양세포주(effector)를 혼합하고 시험관내(in vitro)에서 3일간 배양하여 불활화 종양세포주(effector)에 의한 비장세포(responder)의 증식분석(proliferation assay)을 MTT법으로 측정하였다. 실험군으로 상기 비만세포종이 면역된 비장세포(responder)에 한국산 가시오갈피추출물 500 μ g을 시험관내(in vitro)에서 3일간 배양하여 비장세포(responder)의 증식분석(proliferation assay)을 MTT법으로 측정하였다.

[표 16]

한국산 가시오갈피추출물에 의한 비장세포의 증식분석					
대조군/실험군	재자극 종양 항원의 농도/흡광도치(평균 \pm 표준편차)				
	0	1 \times 10 ⁻⁶	1 \times 10 ⁻⁵	1 \times 10 ⁻⁴	1 \times 10 ⁻³
대조군	0.21 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	0.19 \pm 0.03	0.20 \pm 0.01
대조군(종양항원)	0.25 \pm 0.03	0.38 \pm 0.04	0.31 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01
종양항원 + 한국산 가시오갈피추출물	0.24 \pm 0.04	0.85 \pm 0.09	0.84 \pm 0.06	0.54 \pm 0.06	0.30 \pm 0.03

표 16에 나타난 바와 같이 한국산 가시오갈피추출물을 동시에 투여한 마우스의 P815 비만세포주가 면역된 비장세포인 실험군은 항원인 불활화 종양세포만을 주사한 마우스의 P815 비만세포주가 면역된 비장세포인 대조군에 비하여 상기 항원에 대해 유효한 세포증식(proliferation) 활성을 나타냈으며, 상기 세포증식 활성은 재자극하는 상기 항원에 비례하여 증가하였다. 따라서 한국산 가시오갈피추출물은 상기 항원에 대한 T-세포의 면역능을 증가시키는 활성이 있는 결과를 나타내 비교예 12의 결과를 지지하였으며 이 결과로서 한국산 가시오갈피추출물의 투여는 종양뿐 아니라 바이러스 및 감염세포 등에 대한 효과적인 항원 특이적인 세포성 면역능을 증진시키는 활성이 있음을 확인하였다.

비교예 14

항원 특이적 세포인자(cytokine)의 유도활성

P815 비만세포주에 대한 세포성 면역능의 증진효과는 활성화된 T-세포에서 유도되는 세포인자(cytokine)에 의하여 유도되는 것으로 사료되어 마우스에 PBS만을 투여하여 대조군으로 하고, P815 비만세포주만을 마우스에 투여하여 대조군으로 하였다. P815 비만세포주와 한국산 가시오갈피추출물을 마우스에 투여하여 실험군으로 하였다. 2개의 대조군과 실험군에서 P815 비만세포주에 감염된 마우스의 비장세포의 배양상등액을 이용하여 체액성 면역기구를 조절하는 Th-세포의 Th1 및 Th2 형태의 세포로부터 유도되는 세포인자(cytokine)인 IL-2, IFN- γ 및 IL-4의 유도여부를 각 세포인자 키트(cytokine kit)을 이용하여 측정하였다.

[표 17]

한국산 가시오갈피추출물이 세포인자에 미치는 영향			
대조군/실험군	배양상등액 내의 세포인자 (pg/ml; 평균 \pm 표준편차)		
	IL-2	IFN- γ	IL-4
대조군(PBS)	12.5 \pm 2.1	15.6 \pm 3.1	1.5 \pm 0.6
대조군(종양항원 접종)	104.1 \pm 9.6	125 \pm 11.5	15.6 \pm 2.5
종양항원 + 한국산 가시오갈피추출물	299.2 \pm 25.6	235.2 \pm 21.5	41.5 \pm 3.5

표 17에 나타난 바와 같이 PBS를 투여한 마우스의 경우, 두 타입의 세포인자(cytokine) 모두 검출한계 이하의 세포인자

cytokine)이 검출되었으나 한국산 가시오갈피추출물을 항원과 함께 면역한 경우는 항원 단독으로 면역한 경우에 비하여 2배 이상 증진된 씨토킨(cytokine)이 유도됨을 확인하였다. 이 결과로서 한국산 가시오갈피추출물은 종양항원에 있어서 세포성 면역능을 증진시키는 Th1 타입의 씨토킨(cytokine)뿐 아니라 항체생산과 관련된 체액성 면역반응을 증진시키는 Th2 타입의 씨토킨(cytokine)인 IL-4의 유도를 증진시키는 활성이 있음이 확인하였다.

발명의 효과

상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명인 한국산 가시오갈피를 재료물질로 한 한국산 가시오갈피추출물, 한국산 가시오갈피의 단백질추출물, 한국산 가시오갈피의 조단백다당류추출물을 경구 및 혈관에 투여시 종양세포 및 호흡기질환을 야기하는 세균, 독소 및 바이러스에 대해 직간접적으로 대항하는 대식세포 및 자연살해세포의 활성을 높임으로써 여러가지 감염에 대한 숙주의 방어기작을 증진시키는 활성이 있고, 생체의 체액성 및 세포성 면역체계를 활성화시키는 면역증강활성이 있으므로, 상기 한국산 가시오갈피추출물, 한국산 가시오갈피의 단백질추출물, 한국산 가시오갈피의 조단백다당류추출물을 면역증강용 조성물로 사용한 식품 또는 식품첨가제 및 약제는 남녀 또는 연령에 관계없이 면역능을 증강시킬 수 있으며, 특히 만성질환자의 면역능을 증강시킬 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

한국산 가시오갈피에서 추출한 한국산 가시오갈피추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물.

청구항 2.

제 1항의 한국산 가시오갈피에서 추출한 한국산 가시오갈피추출물을 인산완충살린용액(phosphate buffered saline: PBS)으로 추출하고, 추출된 한국산 가시오갈피추출물에 포화 암모늄 설페이트(NH_4SO_4)용액을 첨가하고 교반하여 단백질분획을 침전시켜, 그 침전된 단백질분획을 PBS로 용해하고 PBS로 투석하며, 투석된 단백질분획을 원심분리하고 상등액을 회수하여 여과한 여과액을 동결건조하여 생산한 단백질추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물.

청구항 3.

제 1항의 한국산 가시오갈피추출물에 에탄올(ethanol)의 최종농도가 70%~80%가 되도록 조정하고, 약하게 교반하여 원심분리하며 침전물을 회수하고, 회수된 침전물을 증류수에 용해시키고 증류수에 대해 투석하여 회수한 물질을 동결건조시켜 생산한 조단백다당류추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물.

청구항 4.

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 면역증강용 조성물을 함유하는 식품.

청구항 5.

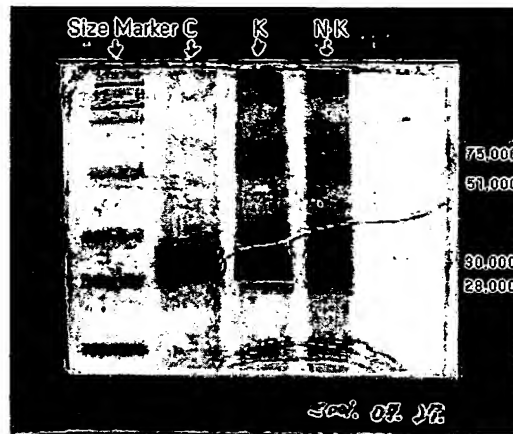
제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 면역증강용 조성물을 함유하는 식품첨가제.

청구항 6.

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 면역증강용 조성물을 유효성분으로 하는 약제조성물.

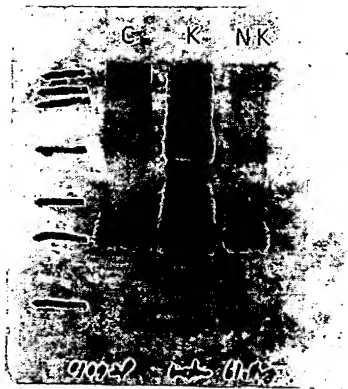
도면

도면1



C: 중국산 가시오갈피추출물
K: 한국산 가시오갈피추출물
N.K: 자연살해세포(Natural Killer cell)

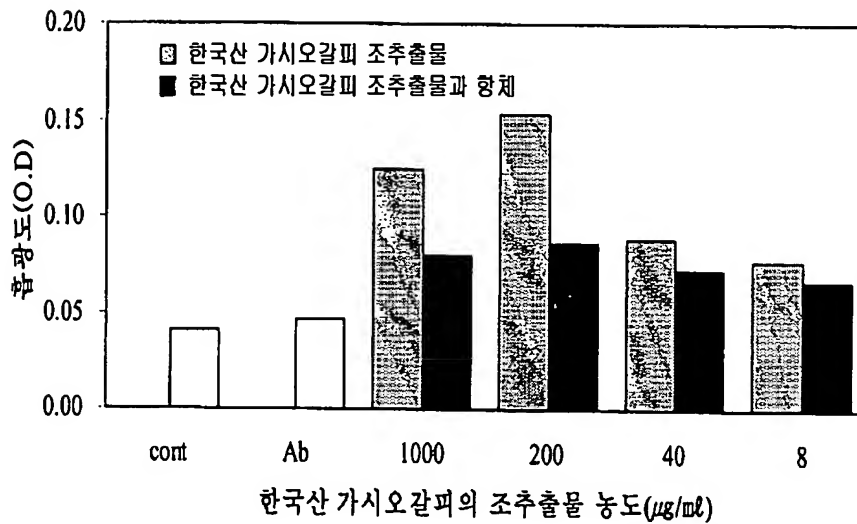
도면2



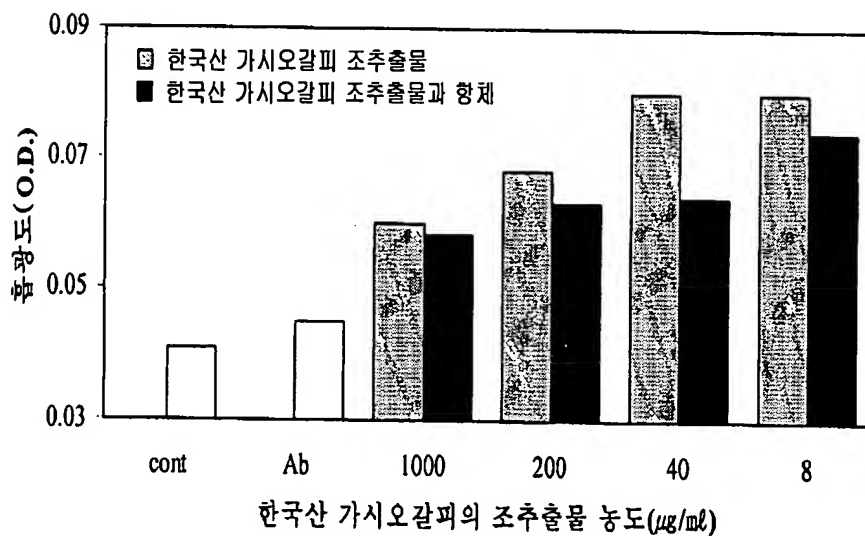
C: 중국산 가시오갈피추출물
K: 한국산 가시오갈피추출물
N.K: 자연살해세포(Natural Killer cell)

BEST AVAILABLE COPY

도면3

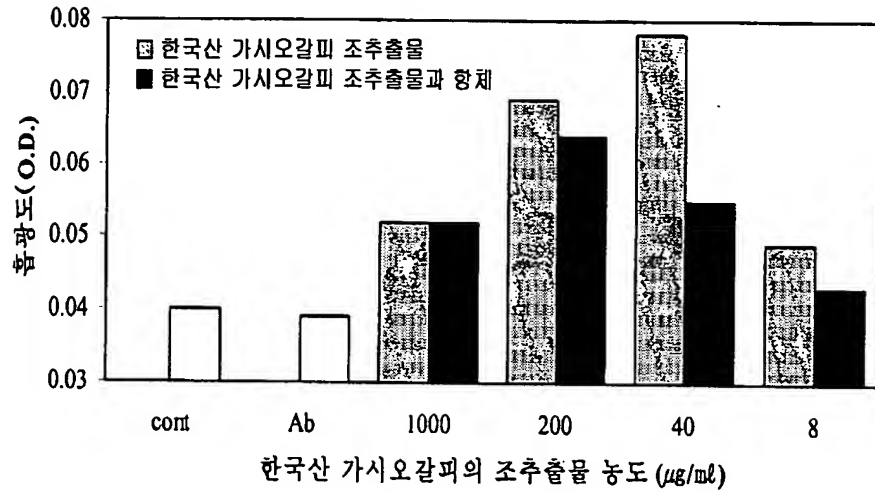


도면4

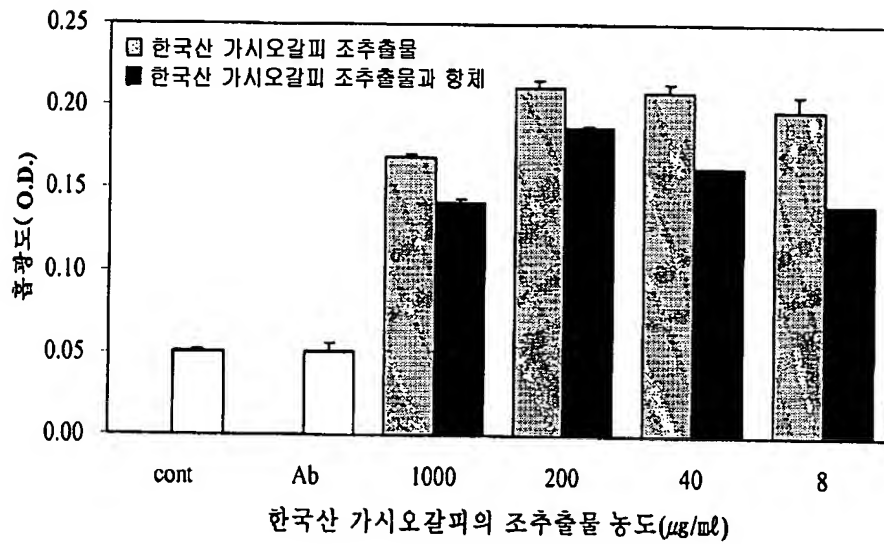


BEST AVAILABLE COPY

도면5



도면6



BEST AVAILABLE COPY